

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA LA DETERMINACIÓN DE SULFAMETOXAZOL Y TRIMETOPRIM EN TABLETAS

*Liliana E. Morales y Jaime H. Rojas**

*Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, AA 141190, Santafé de Bogotá, Colombia.

jairoja@ciencias.ciencias.unal.edu.co[JR1]

RESUMEN

En el presente artículo se publican los resultados obtenidos durante el proceso de desarrollo y optimización de una metodología analítica por cromatografía líquida para la determinación cuantitativa de sulfametoxazol y trimetoprim en tabletas. El método utiliza una columna con octadecilsilano como fase estacionaria y una fase móvil compuesta por metanol: ácido fosfórico 0.01M (23:73) como fase móvil y detección espectrofotométrica a 227nm. El método luego de su validación demostró ser exacto, lineal y preciso dentro de un intervalo de concentraciones entre 20 y 140mcg/mL para sulfametoxazol y entre 4 y 28 mcg/mL para trimetoprim.

Palabras clave: Sulfametoxazol - Trimetoprim - Validation - Cromatografía líquida de alta eficiencia - Fase inversa - Octadecilsilano

VALIDATION OF A CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR THE ASSAY OF SULFAMETHOXAZOL AND TRIMETHOPRIM IN TABLETS

SUMMARY

The results obtained during the standardization of a methodology by reverse high performance liquid chromatography for the assay of sulfamethoxazol and trimethoprim in tablets are

present. For the assay we used a C18 reversed phase column and a mobile phase composed by methanol : phosphoric acid 0.01M (23:73). The wavelength for UV detection was fixed at 227 nm. Linearity was achieved between 20 and 140 mcg/mL and between 3 and 28 mcg/mL for sulfamethoxazol and trimethoprim respectively. The accuracy, precision and robustness were demonstrated.

Key Words: Sulfamethoxazol - Trimethoprim - Validation - High performance liquid chromatography - Reverse phase - Octadecylsilane.

INTRODUCCIÓN

La combinación sulfametoxazol - trimetoprim constituye una buena elección como bactericida de amplio espectro por lo cual se utiliza corrientemente en el tratamiento de patologías relacionadas con las vías respiratorias, con el sistema genitourinario y con el sistema digestivo. La eficacia de esta asociación está directamente relacionada con la concentración de cada uno de los ingredientes activos de la forma farmacéutica. Por tal motivo, su determinación deberá hacerse mediante el empleo de una metodología analítica confiable, la cual ha debido ser previamente validada.

La Farmacopea Americana (1) reporta para tabletas de trimetoprim un método espectrofotométrico para su determinación en la prueba de disolución y un método por cromatografía líquida en fase inversa para determinación del contenido. esta última metodología utiliza una columna C18 de 25 cm x 4.2 mm, una fase móvil compuesta por

Recibido para evaluación:
Aprobado para publicación:

Febrero de 1999
Junio de 1999

ácido acético glacial (1/100) y acetonitrilo (84:16), un flujo de 2 mL/min y detección a 254nm.

Para tabletas de sulfametoxazol y para tabletas de sulametoxazol - trimetoprim, la Far-macopea Americana (1) emplea cromatografía líquida en fase inversa para la determinación de sus contenidos con una fase móvil de acetonitrilo, trietilamina y agua (400:2:1598) ajustando a pH 5.9 con NaOH 0.2N o AcOH diluido, una columna C18 de 30 cm x 3.9 mm, un flujo de 2 mL/min y detección a 254 nm.

Vree et al., desarrollan un método por HPLC para la determinación de los dos principios activos en fluidos biológicos (2), mientras que Meatherall (3) propone una metodología similar para la determinación de trimetoprim en suero.

PARTE EXPERIMENTAL

Equipos

Cromatógrafo Waters 2010, Bomba Waters 510, Inyector Autosampler Waters 717, Detector UV Waters 486, Cromatógrafo Perkin-Elmer, Bomba Serie1, Inyector Rheodyne 7125, Detector Perkin Elmer LC95, columnas para HPLC LiChrospher 60RP - Select B 125 x 4.0mm y μ Bondapack C18 150x3.9mm 10 μ m, precolumna LiChrospher 60RP-Select B Merck.

Reactivos

Metanol, agua y ácido ortofosfórico grado cromatográfico, estándares primarios de sulfametoxazol, trimetoprim, sulfanilamida y ácido sulfanílico, reactivos RA cloroformo, metanol, amoníaco. Además como auxiliares de formulación povidona, estearato de magnesio, dioctilsulfosuccinato de sodio y glicolato de papa.

Sistema Cromatográfico

Luego de algunos ensayos, el sistema cromatográfico estandarizado para seguidamente ser validado quedo establecido así: columna Lichrospher 60 RP-Select B, fase móvil constituida por metanol y ácido fosfórico 0.01M (27:73), flujo 1 mL/min,

longitud de onda 227 nm, atenuación 256 y 20 μ L como volumen de inyección. Los tiempos de retención para el sulfa-metoxazol y el trimetoprim son respectivamente 4.38 y 6.73 minutos.

Validación de la Metodología Analítica.

Como parámetros de validación de la metodología analítica se estudiaron la selectividad, la linealidad del sistema y del método, la precisión, la exactitud y la solidez.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parámetros de idoneidad del sistema cromatográfico.

La evaluación de los parámetros de aceptación del sistema se determinaron a partir del cromatograma obtenido por inyección de 20 μ L una mezcla de sulfametoxazol 10 mcg/mL y trimetoprim 2 mcg/mL. El factor de separación μ fue de 1.91 y la resolución R entre los dos activos de 3.4, valores que garantizan 100% de separación. El número de platos teóricos y el factor de asimetría al 5% de la altura del pico cromato-gráfico calculados para el trimetoprim fueron 2041 y 1.02. Estos valores para el sulfametoxazol fueron respectivamente 2096 y 1.60. En ambos casos los valores son satisfactorios (4-5).

Selectividad.

La selectividad del método analítico se verificó frente a la fase móvil, a una mezcla de los auxiliares de formulación, así como frente a los dos ingredientes activos, sulfanilamida y ácido sulfanílico, productos de descomposición del sulfametoxazol y del ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico, producto de descomposición del trimetoprim. Igualmente se analizó una mezcla constituida por cada una de las sustancias anteriores.

Los cromatogramas obtenidos en cada caso demuestran que las señales correspondientes a cada uno de los dos principios activos no se ven interferidas por otro tipo de señales, con lo cual se

concluye que el método es selectivo, permitiendo así su cuantificación.

En la Figura 1 se presenta el cromatograma obtenido en las condiciones del método para una mezcla de los dos principios activos y de los productos de descomposición. Se observa la resolución adecuada entre los dos activos y de éstos frente a los productos de descomposición.

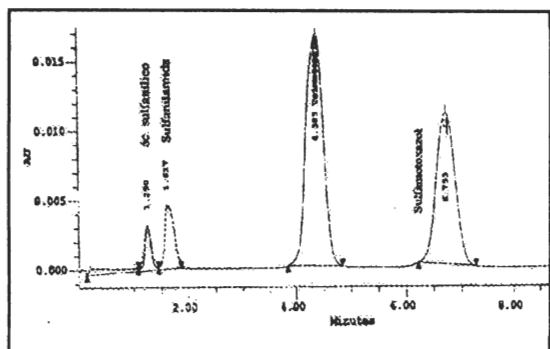


Figura 1. Cromatograma de principios activos y productos de descomposición (Longitud de onda: 227 nm)

El cromatograma no presenta la señal correspondiente al ácido 3,4,5-trimetoxibenzoico debido a que no absorbe a 227nm. Este último deberá ser observado a 210 nm, tal como se observa en el cromatograma de la Figura 2, obtenido con una fase móvil compuesta por metanol y ácido ortofosfórico 0.01M (20:80).

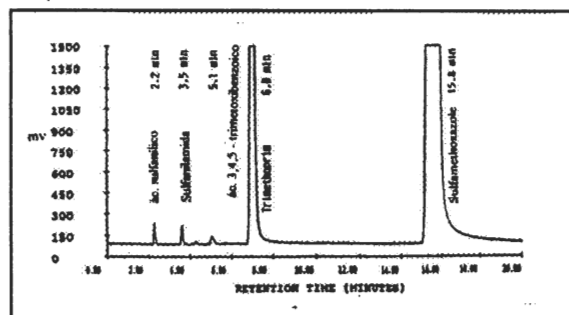


Figura 2. Cromatograma de principios activos y productos de descomposición (Longitud de onda: 210 nm)

Linealidad del Sistema y del Método.

La linealidad del sistema se estudió para cada una de las dos sustancias a 7 niveles de concentración, cada nivel con tres réplicas. Las concentraciones empleadas se situaron entre 16 y 140 mcg/mL para sulfametoxazol y entre 3.3 y 28.8 mcg/mL para trimetoprim. Dentro del intervalo de concentraciones empleadas se observó un comportamiento lineal con correlaciones superiores a 0.998.

Las pruebas de t para intercepto y pendiente indicaron regresiones significativas e interceptos estadísticamente no diferentes de cero. Igualmente, el análisis de varianza de la regresión mediante un test de F, indica en ambos casos regresiones significativas y desvíos no significativos de la linealidad. Las ecuaciones de las rectas de calibración encontradas corresponden a:

$$\begin{aligned} \text{Sulfametoxazol : } & y = 2601626.88 x - 7714.3 \\ \text{Trimetoprim : } & y = 9477986.48 x - 3685.5 \end{aligned}$$

En cuanto a la linealidad del método, analizada sobre mezclas de los auxiliares de formulación, adicionadas en uno u otro caso de sulfametoxazol y de trimetoprim de acuerdo a la formulación del producto, se realizó entre 20 y 140 mcg/mL para sulfametoxazol y entre 4.1 y 28.1 mcg/mL para trimetoprim. Tal como para el sistema, se trabajaron tres réplicas y 7 concentraciones dentro de los intervalos mencionados. Las curvas de calibración se presentan en las Figuras 3 y 4 y los respectivos análisis de varianza en las Tablas 1 y 2. De nuevo, las regresiones son significativas y los puntos alrededor de las rectas de calibración no se alejan significativamente de la linealidad.

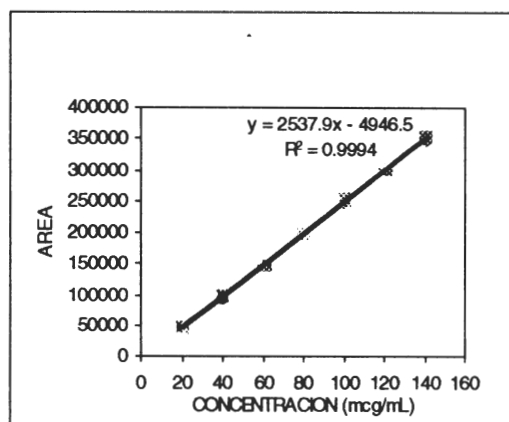


Figura 3. Curva de calibración para sulfametoxazol

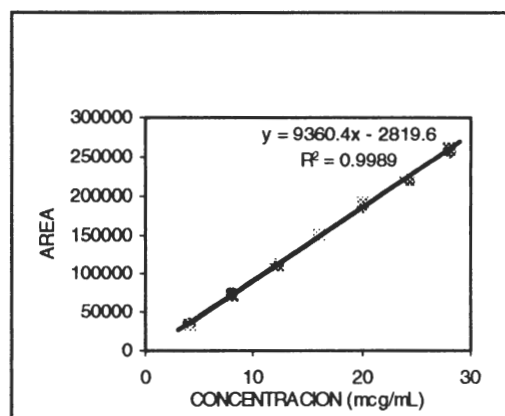


Figura 4. Curva de calibración para trimetoprim

Tabla 2. Sulfametoxazol. Análisis de varianza para linealidad del método

Fuente	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	F tab (0,05)
Regresión	1	2.1648exp+11	2.1648exp+11	32523.47	4.38
Error	19	126463526	66559785.03		
Desvio	5	27926164.9	5585232.98	0.84	2.74
Dentro	14	98537360.7	7038382.9		
Total	20	2.166exp+11			

Tabla 3. Linealidad. Análisis de varianza para linealidad del método

Fuente	gl	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	F tab (0,05)
Regresión	1	1.1801exp+11	1.1801exp+11	17540.37	4.38
Error	19	127831074	6727951.28		
Desvio	5	70125702.9	14025140.6	2.08	2.74
Dentro	14	577053.13	4121812.24		
Total	20	1.1814exp+11			

Precisión del Sistema y del Método

Los coeficientes de variación calculados para el sistema y para el método se determinaron a un sólo nivel de concentración mediante 10 determinaciones. En ambos casos y para cada una de las dos sustancias los valores no fueron superiores a 2%, valor aceptado como máximo para métodos cromatográficos, indicando adecuada repetibilidad.

Igualmente se evaluó la precisión intermedia

mediante análisis en diferentes días y equipos y preparadas por analistas diferentes. Para un total de 36 determinaciones el coeficiente de variación fue de 1.65% para sulfametoxazol y de 1.60% para trimetoprim.

Exactitud del Método

La evaluación de este parámetro se llevó a cabo a través una prueba de t de Student y mediante

la determinación de los porcentajes de recuperación para cada principio activo. Se estudiaron tres niveles de concentración correspondientes al 80, 100 y 120%, cada nivel con tres réplicas (Tabla 4).

Los valores de *t* encontrados para las dos sustancias indican que las recuperaciones no son estadísticamente diferentes del 100%, mientras que los valores de *G* de la prueba de Cochran indican que el nivel de concentración no afecta los resultados.

Solidez del Método

Para el estudio de la solidez del método se efectuaron pequeños cambios a nivel del sistema cromatográfico que se esperaban afectaran los resultados de su aplicación. Mediante 6 experimentos se analizó la influencia de cambios en 5 factores, realizando variaciones por arriba o por debajo de algunos de ellos. En la Tabla 4 se observan los cambios realizados sobre el método inicialmente desarrollado.

El análisis de los resultados se efectuó según lo establecido por Youden (7), encontrándose que el método no se afecta por los cambios realizados, a excepción del tiempo de preparación de la muestra (factor B), el cual debe ser controlado.

Tabla 4. Resultados del estudio de solidez del método analítico

Nivel normal	Desafío 1	Desafío 2
A = columna 1	A = columna 2	A = columna 2
B = 30 minutos	B = 24 horas	B = 24 horas
C = 1.0 mL/min	C = 1.2 mL/min	C = 0.8 mL/min
D = 227 nm	D = 232 nm	D = 222 nm
E = metanol 27% H3PO4 0.01M 73%	E = metanol 30% H3PO4 0.01M 70%	E = metanol 24% H3PO4 0.01M 76%

Aplicaciones

El método analítico validado se aplicó a un lote de tabletas que sobrepasaba su fecha de expiración. El cromatograma obtenido presentó únicamente las señales correspondientes a los principios activos, lo cual y de acuerdo a la selectividad del método ya establecida, es indicativo de la estabilidad de la forma farmacéutica (Figura 5).

El método se aplicó satisfactoriamente para la determinación de los dos principios activos en un lote de tabletas de reciente elaboración.

Conclusiones

Se desarrolló y validó un método analítico por cromatografía líquida en fase inversa para la valoración de sulfametoxazol y trimetoprim en

tabletas. El método utiliza una columna con octadecilsilano como fase enlazada y una fase móvil compuesta por metanol y ácido ortofosfórico 0.01M en proporciones 27% y 73% respectivamente. El método es selectivo, lineal, exacto y preciso. Al permitir una perfecta separación entre los principios activos y los productos de degradación, el método puede ser empleado en estudios de estabilidad.

La reproducibilidad y confiabilidad del método son adecuadas aún si se presentan pequeñas variaciones en sus parámetros de operación.

La fase móvil desarrollada es económica y menos agresiva para el sistema que otras reportadas por la literatura.

BIBLIOGRAFÍA

1. The United States Pharmacopoeia USP XXIII, The United States Pharmacopoeial Convention Inc, De Rockville, 1995.
2. Vree et al., Determination of Trimethoprim and Sulfamethoxazole (Co-Trimoxazole) in Body Fluids of Man by Means of High-Performance Liquid Chromatography. *J. of Chrom.* **146**, 103 (1978)
3. Meatherall, R., High-Performance Liquid Chromatography Determination of Trimethoprim in Serum, *Therapeutic Drug Monitoring.* **11**, 79 (1989)
4. Castro, M.C., Gascon, S.F., *Validación de métodos analíticos*, Comisión de Normas de Buena Fabricación y Control de Calidad, Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria Sección Catalana. 1989.
5. Quattrochi, O.A., Laba, R.F., Belaira, S., *Introducción a la cromatografía líquida de alta eficiencia, aplicación y práctica*, Buenos Aires - Argentina, 1992.
6. Morales, L.E., *Validación de la Metodología Analítica Empleada en la Determinación de los Principios Activos de Tabletas de Trimetoprim y Sulfametoxazol*, Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, Santafé de Bogotá, 1997.
7. Youden, W.J. , The Collaborative Test, *J. of the AOAC*, **45**, 169 (1962).